

УДК 616.348-002.44-078:543.544-08

ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЕГО ЛЕЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Н.Н. Миронов, зам. главного врача, ГУЗ «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», **С.В. Насонов**, ООО «Медицинская диагностика», **О.П. Алексева**, д. м. н., профессор, директор Федерального гастроэнтерологического центра ПФО РФ при ГУЗ НОКБ им. Н.А. Семашко

В результате проведенных исследований было установлено, что метод высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови может быть использован для диагностики активного язвенного колита. Диагностическая чувствительность и точность метода составили 100%. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии может быть использован у больных язвенным колитом для оценки эффективности лечения, для разграничения больных с полным и частичным ответом на лечение.

As a consequence of conducted researches it was determined that the method of high-yield liquid chromatography of blood serum might be used for ulcerative colitis's diagnostics. Diagnostic perceptibility and accuracy of the method were 100%. The method of high-yield liquid chromatography might be used for patients with ulcerative colitis for evaluation of treatment's effectiveness and for demarcation of patients with full and partial response to the treatment.

Воспалительные заболевания кишечника, прежде всего язвенный колит, по тяжести течения, частоте осложнений, инвалидизации трудоспособного населения занимает одно из ведущих мест в структуре болезней желудочно-кишечного тракта. При этом во всем мире и в России отмечается четкая тенденция увеличения распространенности этой патологии среди всех возрастных групп [1, 10].

Существенные трудности в диагностике воспалительных заболеваний кишечника связаны как с поздним обращением пациентов за медицинской помощью, самолечением по поводу диареи, плохой осведомленностью врачей первичного звена об этих заболеваниях, так и многообразной клинической картиной с системными проявлениями, необходимостью использования для диагностики эндоскопических методов (фиброскопии, биопсии). Все это заставляет больных ходить по кругу: терапевт (врач общей практики), инфекционист, колопроктолог, терапевт. Средние сроки постановки диагноза язвенного колита от начала заболевания составляют от 2 до 8 месяцев [1].

В настоящее время для первичной верификации диагноза язвенного колита необходимо обязательное использование трёх методов: рентгенологического, эндоскопического и морфологического. В 15-20% случаев язвенный колит не может быть дифференцирован по морфологическим данным от других воспалительных заболеваний кишечника [6].

Все это предполагает необходимость постоянного поиска новых диагностических методов язвенного колита.

В современной аналитической химии и биохимии широко применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [7]. Он удачно сочетает в себе высокую точностью качественного и количественного анализа веществ, высокую автоматизацию исследования на основе доступных вычислительных мощностей и алгоритмов математической обработки данных.

Современная высокоэффективная жидкостная хроматография способна проводить разделение смеси на составляющие компоненты с последующим выделением сверхчистых фракций веществ [5, 7], которые могут быть использованы как биомаркеры в диагностике заболеваний.

Цель: исследование возможности применения высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для диагностики язвенного колита.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 46 больных язвенным колитом (26 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 21 до 56 лет – основная группа. В контрольную группу вошли 14 практически здоровых добровольцев в возрасте от 23 до 54 лет.

Больные язвенным колитом имели давность заболевания от 1 года до 15 лет, большинство больных (40%) – от 1 года до 5 лет. Диагноз у всех больных верифицирован эндоскопически и морфологически. В исследование не включались больные с тяжелой сопутствующей патологией. Среди сопутствующих заболеваний наиболее частыми были хронический гастрит, хронический бескаменный холецистит вне обострения, контролируемая артериальная гипертензия.

Тяжесть язвенного колита оценивали по критерию PGA, который в свою очередь определялся по индексу клинической активности Mayo с непосредственной визуальной оценкой слизистой оболочки толстого кишечника при колоноскопии, оценкой частоты стула и наличия в нем крови. Данная система оценки степени тяжести язвенного колита считается наиболее точной и часто применяется в научных исследованиях [2, 9].

В исследование были включены только больные с умеренной (средней) степенью тяжести заболевания с поражением толстой кишки на расстоянии более 15 см от анального отверстия (для исключения изолированного проктита) с целью формирования максимально возможной однородной группы для

последующего забора крови и выполнения спектрометрического анализа сыворотки крови.

Фиброколоноскопия больным проводилась при помощи аппарата «Olympus CV-70» дважды: до назначения лечения и для промежуточной оценки эффективности терапии через 6 недель приема лекарственных препаратов. По протяженности поражения толстой кишки выявлена локализация воспалительного процесса: проктосигмоидит – у 21 больного (45,6%), левосторонний колит – у 20 лиц (43,5%) и субтотальное поражение – у 5 больных (10,9%). Для лечения язвенного колита средней степени активности были использованы препараты 5АSА-месалазин в дозах от 2,4 до 4,8 грамма в сутки.

Методы исследования. В качестве исследуемого субстрата была использована сыворотка крови. Забор крови проводился у пациентов натощак из вены в количестве 5-10 мл. Полученная сыворотка (не менее 2 мл) высушивалась при 25°C до состояния сухой корочки и перемалывалась до состояния гомогенного порошка. Далее бралась навеска порошкообразной сыворотки в количестве 40 мг и проводилась экстракция 85% метанолом – 200 мкл в течение 45 минут. После осаждения крупно- и среднемолекулярных белков проводилось центрифугирование смеси при ускорении 12 000 об./мин. с последующим отбором надосадочной жидкости. Полученный таким образом экстракт сыворотки крови подвергался хроматографическому исследованию.

При анализе использовалась стандартная методика исследования на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», г. Новосибирск). Современные жидкостные хроматографы на микроколонках типа «Милихром А-02» представляют собой аналитический комплекс функционально объединенных устройств, обеспечивающих разделение жидких смесей, детектирование, идентификацию и количественный учет компонентов смеси. Контрольная программа встроенного в спектрофотометр компьютера не допускает неправильных и несовместимых параметров, обеспечивая автоматический набор пробы, спектрофотометрическое детектирование, объективность и высокую точность анализов. Статистическая обработка при помощи многоуровневого кластерного анализа и построение образов проводились при помощи специальной компьютерной программы [5].

Результаты исследований и обсуждение. В исследование были включены больные язвенным колитом средней степени тяжести на основании оценки индекса PGA=2. Такое значение PGA, в основном, соответствовало индексу Mayo колоноскопии 2 (умеренно выраженные изменения). Частота стула в сутки варьировала от 1-2 раз больше нормы у 20 больных (43,5%) до 3-4 раз больше нормы – у 26 больных (56,5%). Степень ректальных кровотечений соответствовала 1 (примесь крови в кале в большей части дефекаций) у 32 больных (69,6%) и 2 (явная кровь в кале в большей части дефекаций) – у 14 больных (30,4%). Системные проявления болезни в виде субфебрильной температуры отмечались у 6 больных (13,0%) и артралгии – у 8 больных (17,4%).

После выполнения анализов сыворотки крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и статистической обработки хроматограмм при помощи кластерного анализа установлены диагностические показатели и критерии диагностики для больных язвенным колитом средней степени. Результаты анализа приведены в таблице 1 и показаны на рис. 1.

Таблица 1. Результаты статистического анализа для диагностики между группами контроля и больных язвенным колитом при помощи ВЭЖХ сыворотки крови

Показатели	Контроль	Язвенный колит
Количество больных	14	46
Истинная диагностика	14	46
Гиподиагностика	0	0
Чувствительность диагностики (%)	100	100
Диагностическая точность (%)	100	
Критерий хи-квадрат	55,9086	
Уровень вероятности (%)	99,94	

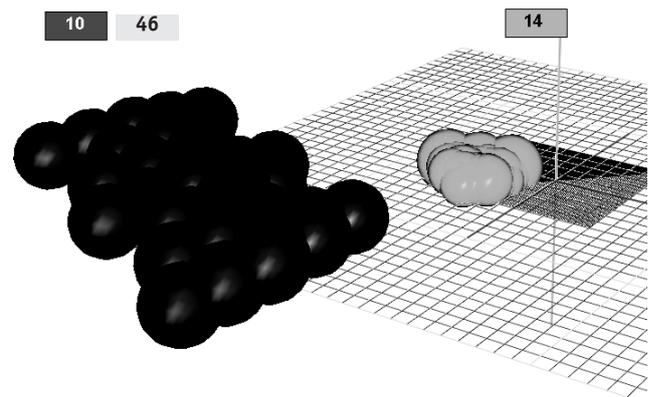


Рис. 1. Жидкостно-хроматографические спектральные образы сыворотки крови контрольной группы (светлая окраска) и больных язвенным колитом (темная окраска).

Выделение больных от лиц контрольной группы оказалось высоко достоверным. Чувствительность диагностики и диагностическая точность составили 100%.

На рис. 1 показано, что жидкостно-хроматографические спектральные образы сыворотки крови больных язвенным колитом и здоровых лиц не пересекаются и пространственно разделены.

Промежуточная оценка эффективности лечения проводилась через 6 недель терапии, после проведения повторной колоноскопии с определением индекса PGA.

В качестве первичного показателя эффективности рассматривалась доля пациентов с терапевтическим эффектом, определяемым как улучшение индекса PGA на конец периода лечения (6-я неделя) по сравнению с исходным состоянием. Улучшением считался полный ответ (стойкая ремиссия) или частичный ответ (стабилизация отдельных клинических признаков) на фоне лечения. Полный ответ определялся как PGA=0, то есть полное разрешение или нормализация следующих показателей: частота дефекации, ректальные кровотечения, индекс колоноскопии (Mayo). Частичный ответ определялся как PGA=1. При отсутствии клинического ответа на лечение PGA=2. Результаты выполненных оценок приведены в таблице 2.



Таблица 2. Оценка терапевтического эффекта месалазина при лечении язвенного колита умеренной активности

Уровень ответа на лечение	Число и доля (%) откликов на лечение
Полный	9/46 (19,6%)
Частичный	34/46 (73,9%)
Нет ответа	3/46 (6,5%)

Общая оценка терапевтической эффективности лечения язвенного колита может быть проведена по критерию статистической достоверности различий индексов PGA у пациентов до и после заданного периода лечения. Поскольку индекс PGA с точки зрения математической статистики представляет собой порядковый показатель с 4 уровнями измерения (от 0 до 3) для его сравнительных оценок адекватно применение непараметрических критериев, в частности критерия U-Вилкоксона-Манна-Уитни [8]. Вычисленные параметры данного критерия позволяют сделать заключение о статистически значимом ($p < 0,05$) уменьшении индекса PGA у пациентов с язвенным колитом на период окончания лечения и, соответственно, о терапевтической эффективности месалазина.

Применение технологии фиксации жидкостно-хроматографических спектральных образов сыворотки крови позволило расширить возможности оценки эффективности лечения язвенного колита. На рис. 2 показано распределение спектральных образов сыворотки крови в группе больных язвенным колитом до и после лечения месалазином.

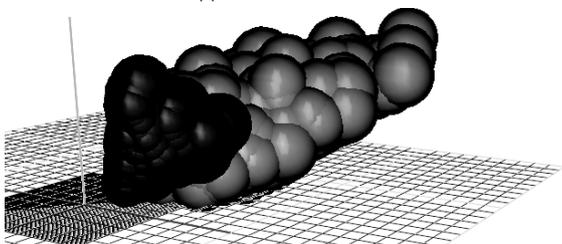


Рис. 2. Жидкостно-хроматографические спектральные образы сыворотки крови в группах больных язвенным колитом до лечения (синяя окраска) и после лечения (зеленая окраска) месалазином.

Статистический анализ построенных спектральных образов, приведенный в таблице 3, показывает довольно высокую диагностическую точность (72,8%) разграничения групп больных язвенным колитом до и после лечения месалазином с уровнем вероятности 96,02%.

Проводя обсуждение результатов исследования необходимо подчеркнуть, что сыворотка крови, несмотря на то что является очень сложной по своему составу, подчинена единым физико-химическим принципам строения и функционирования биологических жидкостей. При дегидратации молекулы и молекулярные комплексы претерпевают пространственные перемещения и локализуются в строго определенном месте в форме фиксированной волны по ВЭЖХ. При этом каждая волна соответствует градиенту концентрации определенной группы ассоциированных молекул, близких по своей физико-химической структуре.

Таблица 3. Статистические показатели ВЭЖХ оценки общей эффективности лечения месалазином больных язвенным колитом

Показатели	До лечения	После лечения
Количество больных	46	46
Истинная диагностика	39	28
Гиподиагностика	7	18
Чувствительность диагностики (%)	84,7	60,86
Диагностическая точность (%)	72,8	
Критерий хи-квадрат	15,1132	
Уровень вероятности (%)	96,02	

В сыворотке крови подавляющее большинство молекул находится в виде надмолекулярных комплексов. Организационная аутоволновая структура дегидрированной сыворотки отражает спектр этих комплексов на хроматограмме. Фазовый переход биологической жидкости из неупорядоченного жидкого состояния в твердое путем высушивания организует определенный стохастический порядок, который становится наблюдаемым даже на макроскопическом уровне. Волновые ритмы различного характера и качества являются одной из форм самоорганизации живой материи и ее взаимосвязи как с внутренней, так и с внешней средой.

При любом заболевании наблюдаются изменения в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот, полипептидов и других соединений, которые поступают в кровь и могут быть обнаружены. Почти все зарегистрированные на хроматограмме пики являются олигопептидами, пептидами или низкомолекулярными белками. На этом основании существует вполне реальная возможность использования метода ВЭЖХ для лабораторной диагностики многих заболеваний, и в частности язвенного колита.

Диалектически сам метод высокоэффективной жидкостной хроматографии уникально сочетает элементы анализа, определяемые хроматографическим разложением такого биологического субстрата организма, как сыворотка крови, на микроструктуры, и элементы синтеза, осуществляемые посредством многоуровневого кластерного анализа с формированием стабильного положения конечного образа в трехмерном пространстве.

Выводы

1. Метод ВЭЖХ может быть использован для диагностики активного язвенного колита. Диагностическая чувствительность и точность метода составила 100%.
2. Метод ВЭЖХ может быть использован у больных язвенным колитом для оценки эффективности лечения, для разграничения больных с полным и частичным ответом на лечение.



ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова Е.А. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника в России. – Материалы Фальк симпозиума. – № 154. – 2006. – С. 38-39.
2. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона. – Тверь: Триада, 2002.
3. Насонов С.Н., Диш А.Ю., Хазанов В.А. Особенность высокоэффективной жидкостной хроматографии анализа гликазида в плазме крови // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии. – Томск; Изд-во Том. ун-та, 2001. – С. 61-63.
4. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: пер. с англ. / Под ред. А. Хеншин. – М.: Мир, 1988. – 688 с.

5. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 200761453. Программа для обработки спектров и создания экспертных диагностических систем DataStat / Насонов С.В. и соавт., 2007.
6. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезни желудка и кишечника. – М.: Триада-Х, 1998. – 496 с.
7. Барам Г.И. Хроматограф «Милихром А-02». Определение веществ с применением баз данных «ВЭЖХ-УФ». – Новосибирск, 2005. – 64 с.
8. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1978. – 294 с.
9. Truelove S.C., Witts L.S. Cortisone in Ulcerative Colitis // *British Medical Journal*. – 1955. – № 2. – P. 1041.
10. Loftus E.V.Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence prevalence, and environmental influences // *Gastroenterol.* – 2004. – V. 126, № 6. – P. 1504-1517.